Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg

Institutsvorstände: Prof. Dr. med. E. Wecker und
Prof. Dr. med. V. ter Meulen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON CYCLOHEXIMID UND CORDYCEPIN AUF DIE REPLICATION DES MASERN-VIRUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Dieter Albert Genius

aus Bardenberg/Aachen

Würzburg, den 24.1.1980

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der
Universität Würzburg

Institutsvorstände: Prof. Dr. med. E. Wecker und
Prof. Dr. med. V. ter Meulen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON CYCLOHEXIMID UND CORDYCEPIN AUF DIE REPLICATION DES MASERN-VIRUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Dieter Albert Genius

aus Bardenberg/Aachen

Würzburg, den 24.1.1980

Referent: Professor Dr. V. ter Meulen

Korreferent: Professor Dr. Dr. K. Hempel

Dekan: Professor Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0039

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	4
I. Material	4
II. Methoden	10
C. ERGEBNISSE	17
1. Zeitlicher Verlauf der RNS-Synthese	17
2. Sedimentationsanalyse virusspezifischer RNS	19
3. Nachweis der poly (A)-Ketten in virusspezifischer RNS	22
4. Chromatographische Untersuchung der Polynukleotidbindung masernspezifischer RNS	24
5. Größe der poly (A)-Ketten	25
6. Bestimmung der Bindungsstelle der poly (A)-Ketten an die virusspezifische RNS	26
7. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer RNS	28
8. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer intrazellulärer Strukturen	30
9. Die Wirkung von Cordycepin auf die virusspezifische RNS-Synthese	33
10. Die Wirkung von Cordycepin auf die Synthese virusspezifischer intrazellulärer Strukturen	36
11. Die Wirkung von Cycloheximid und Cordycepin auf den Gehalt an poly(A)-Ketten der viralen mRNS	38
12. Die Wirkung von Cordycepin und Cycloheximid auf die Proteinsynthese	40
D. DISKUSSION	42
E. ZUSAMMENFASSUNG	48

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN:

CBS	-	concentrated salt buffer
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
EB	-	eluting buffer
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
FKS	-	fötales Kälberserum
MEM	-	minimal essential medium
mRNS	-	messenger Ribonukleinsäure
µc	-	Mikro-Curie
µg	-	Mikro-Gramm
µl	-	Mikro-Liter
NDV	-	Newcastle Disease Virus
NTE	-	NaCl-Tris-EDTA-Puffer
PBS	-	phosphate buffered saline
p.f.u.	-	plaque forming unit
POPOP	-	2,2'-p-Phenylenbis (4-methyl-5-phenyloxazol)
PPO	-	2,5-Diphenyloxazol
RNS	-	Ribonukleinsäure
rpm	-	Umdrehungen/min.
RSB	-	Reticulocyten-Standard-Puffer
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SSPE	-	subakute sklerosierende Panenzephalitis
TCA	-	Trichloressigsäure
Tris-HCl	-	Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNS	-	transfer Ribonukleinsäure
VSV	-	vesicular stomatitis virus

A. EINLEITUNG

Das Masernvirus baut sich aus drei Hauptbestandteilen auf. Im Inneren befindet sich ein RNS-Strang, der einen Sedimentationskoeffizienten von 50 s aufweist, was einem Molekulargewicht von 5 - 6 x 10^6 entspricht. In dieser RNS ist die genetische Information für das Wachstum und die Replikation des Masernvirus determiniert. Diese RNS befindet sich innerhalb eines Nukleokapsid, welches wiederum von einem Envelope, einer lipoidhaltigen Hülle, umgeben ist. Letztere weist Glycoproteinstrukturen auf, welche die Ursache für Hämagglutinations- und Zellfusionsaktivitäten des Masernvirus sind (16).

Auf Grund seiner biochemischen Eigenschaften und seines morphologischen Erscheinungsbildes wurde das Masernvirus unter die Paramyxoviren eingeordnet (15,23).

Das Masernvirus stellt ein ubiquitäres hochkontagiöses Agens dar, das in einem seronegativen Organismus eine akute Erkrankung hervorruft. Diese Infektionskrankheit wird im allgemeinen komplikationslos überstanden und hinterläßt eine lebenslange Immunität. Als Komplikationen sind die Otitis media, Masernpneumonie oder Masernenzephalitis bekannt. In den letzten Jahren wurde dieses Virus jedoch auch für die Slow-Virus-Infektionen verantwortlich gemacht. Virologische Untersuchungen lokalisierten Masernvirus im Zentralnervensystem bei der SSPE und dokumentierten einen ätiologischen Zusammenhang zwischen dem Masernvirus und dieser chronischen ZNS-Erkrankung. Immunologisch-virologische Studien bei der multiplen Sklerose wiesen darüber hinaus auf eine mögliche Beteiligung des Masernvirus bei dieser Erkrankung hin. Diese Untersuchungen haben das medizinisch-virologische Interesse an diesem Erreger erheblich gesteigert und dazu geführt, daß sich viele Arbeitsgruppen mit der

Paramyxovirusgruppe intensiv beschäftigen.

Der Nachweis des Masernvirus im ZNS bei SSPE-Patienten weist deutlich auf eine Viruspersistenz in diesem Organ hin. Welche Mechanismen für die Persistenz jedoch verantwortlich sind, ist bislang ungeklärt. Zum Verständnis der Persistenz des Masernvirus ist jedoch zunächst notwendig, grundlegende Informationen über die Replikation einer lytischen Maserninfektion zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Teilaspekten der Syntheseschritte des Masernvirus in Gewebskulturen in Gegenwart von Cycloheximid und Cordycepin.

Die Untersuchungen führten in 3 Hauptrichtungen:

1. Die Isolierung und Reinigung virusspezifischer RNS.
2. Die Charakterisierung virusspezifischer RNS.
3. Die Wirkung von Cycloheximid und Cordycepin auf die Masernvirusreplikation.

Die Autoren Carter et al. (1973) (6) und Winston et al. (1973) (42) führten Untersuchungen über die Actinomycin-D-Wirkung auf Masernvirus infizierte Zellen durch. Hierbei wurden RNS nachgewiesen, die den Paramyxoviren ähnliche Sedimentationskoeffizienten aufwiesen (3,5,21,23).

Der größte Teil der RNS sedimentierte im Bereich zwischen 18 s und 20 s; geringere Anteile im 35 s Bereich. Zieht man die Paramyxoviren zum Vergleich heran, so kann man diese RNS als neu synthetisierte virale messenger (m) RNS auffassen (3,22). Neu synthetisierte 50 s RNS wurde in früheren Arbeiten nur gelegentlich nachgewiesen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden jedoch unter Bedingungen durchgeführt, die die Bildung defekter Viruspartikel sehr begünstigen. Die verwandten Viruspräparationen wiesen nur geringe Titer auf und wurden in hohen Konzentrationen Gewebekulturen hinzugegeben, um eine 100 %ige

Infektion der Gewebekulturzellen zu erreichen, was zur Synthese defekter Viruspartikel führte (17,20). Defekte Masernviruspartikel enthalten jedoch vor allem virale 18 s - RNS, wodurch die mRNS-Analysen erschwert werden. Um diesen Fehler auszuschließen, wurden für die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen eine Masernviruspräparation mit einem Titer von 3×10^7 p.f.u./ml eingesetzt, die keine DI-Partikel enthielten. Hierdurch waren die notwendigen Voraussetzungen geschaffen, eine verbesserte virale RNS-Analyse in infizierten Zellen vorzunehmen. Die Hinzuziehung von Cycloheximid und Cordycepin zu diesen Untersuchungen erfolgte, um festzustellen, ob die Masernvirusreplikation in gleicher Weise zu beeinflussen ist, wie dies für andere Paramyxoviren beschrieben wurde. Auf Grund einer Publikation von Kiley und Payne (20) scheint Cycloheximid die Synthese der 50 s RNS des Masernvirus nicht zu hemmen, was ganz im Gegensatz zu anderen Paramyxoviren stehen würde.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Chemikalien:

Actinomycin D	Merck, Darmstadt
Äthanol absolut. p.A.	Merck, Darmstadt
Äthylenglycolmonoäthyläther	Merck, Darmstadt
Cordycepin	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
Cutscum	Fischer Company N.Y., USA
Cycloheximid	Serva, Heidelberg
Desoxycholat	Merck, Darmstadt
EDTA, Äthylendiamintetra-essigsäure	Serva, Heidelberg
Dioxan	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutamin	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Sarkosylsulfat	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Naphthalin	Merck, Darmstadt
NaCl 0,1 M; 1,0 M	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat x 12 H_2O	Merck, Darmstadt
NaOH 0,1 N	Merck, Darmstadt
oligo d (T)-Zellulose	Searle Research Company Ltd., London
Penicillin	Hoechst, Frankfurt/M

poly (U)-Sepharose 4 B	Pharmacia
POPOP, 1,4 - 2- (5-Phenoxazolyl-) -Benzol	Roth, Karlsruhe
PPO, 2,5-Diphenyloxazol	Roth, Karlsruhe
Sacharose (RNAse frei)	Boehringer, Mannheim
SDS, Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Hoechst, Frankfurt/Main
TCA, Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris-HCl, Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt

2. Seren:

Fötales Kälberserum (FKS)	Biocult Laboratories Ltd. Paisley, Schottland

3. Nährlösungen:

MEM: minimal essential medium nach Eagle (1959) (11) der Fa. Gibco, Long Island, N.Y., das pro Liter mit 2, 5 bzw. 10 % FKS, sowie 100 Einheiten Penicillin und 100 ug/ml Streptomycin komplettiert wird. Die pH-Einstellung erfolgte mit Natriumbicarbonat. Als Indikator diente Phenolrot.

Aminosäure freies Medium:

Es wurde das oben beschriebene Medium verwendet, ohne Zusatz jeglicher Aminosäuren und Seren.

4. Enzyme:

Pankreasribonuklease	Boehringer, Mannheim
Polynukleotidphosphorylase von Micrococcus luteus	Boehringer, Mannheim
T_1-Ribonuklease	Boehringer Mannheim
Trypsin	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

5. Lösungen:

Bray-Lösung:

POPOP	0,2 g
PPO	4,0 g
Naphthalin	60,0 g
Methanol	100,0 g
Äthylenglycolmonoäthyläther	20,0 ml
Dioxan	ad 1000,0 ml

Ca-freier Puffer:

KCl	0,2 g
KH_2PO_4	0,2 g
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	0,572 g
NaCl	8,2 g
Aqua bidest. steril.	ad 1000,0 ml

Concentrated Salt Buffer (CBS):

Tris	6,05 g
Na_2EDTA	3,72 g
NaCl	40,88 g
Formamid	250,0 ml
Aqua dest. steril.	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.

Cutscum-Lösung:

Cutscum	0,05 ml
Desoxycholat	0,05 g
RSB	ad 10,0 ml

Eluting Buffer (EB):

Stammlösung:

K_3PO_4	4,6 g
Na_2 EDTA	7,44 g
Sarkosylsulfat	4,0 g
Aqua dest.	ad 200,0 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung	10,0 ml
Formamid	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.

Enzympufferlösung:

Die Lösung enthält:

Tris (pH 8,5)	0,1 M
NaH_2PO_4	0,01 M
$MgCl_2$	0,005 M
Polynukleotidphosphorylase von Micrococcus luteus	25 µg/ml

NaCl-, Tris-, EDTA-Puffer (NTE):

NaCl	5,844 g
Tris-HCL	1,2144 g
EDTA	0,2923 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde mit 0,1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Phosphat Bufferd Saline (PBS):

KH_2PO_4	0,25 g
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	2,4 g
NaCl	8,8 g
Aqua bidest. steril.	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde per Seitzfiltration EKS I sterilisiert (10).

Reticolocyten-Standard-Puffer (RSB):

nach Warner et al. (1963) (39)

SSC-Puffer:

0,06 M NaCl	500,0 ml
0,06 M Natriumcitrat	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde per Seitzfiltration EKS I sterilisiert.

STES-Puffer:
Eine wässrige 0,1 %ige SDS-Lösung enthält:

Tris-HCl (pH 7,4)	0,01 M
NaCl	0,5 M
EDTA	0,001 M

TES-Puffer:
Eine wässrige 0,1 %ige Lösung enthält:

Tris HCl (pH 7,4)	0,01 M
EDTA	0,001 M

Trypsinlösung:

NaCl	80,0 g
KCl	4,0 g
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	1,0 g
Tris	30,0 g
Penicillin	1,0 g
Streptomycin	1,0 g
Aqua bidest.	ad 10,0 l

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,5 - 7,7 eingestellt.

Versenlösung:

Die Lösung enthält 0,02 % EDTA in Ca-freiem Puffer.

6. Radioaktive Substanzen:

^3H-Uridin, ^3H-Adenosin und ^{14}C-Proteinhydrolysat wurden von der Fa. Amersham Buchler, Frankfurt/Main bezogen.

II. Methoden

1. Zellkultur:

Zur Vermehrung des Masernvirus wurden Verozellen verwendet. Diese Zellen wurden in Roux-Flaschen mit jeweils 90 ml Medium (5 % FKS) als Monolayer gezüchtet. Eine zu einem dichten Rasen gewachsene Zellkultur enthielt etwa 8×10^7 Zellen. Zur Zellvermehrung wurde das Medium dekantiert. Anschließend wurden je 2,0 ml Versen- und Trypsinlösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 - 12 min bei 37° C lösten sich die Zellen von der Glaswand. Darauf erfolgte die Zugabe von 5,0 ml Medium (5 % FKS), um die Zellen kräftig aufzuwirbeln. Die so erhaltene Suspension wurde je nach Bedarf auf 2, 3 oder 4 neue Roux-Flaschen gleichmäßig verteilt. Nach Auffüllen der Roux-Flaschen mit Medium (5 % FKS) auf 90 ml wurden diese Flaschen verschlossen und bei 37°C im Brutraum inkubiert. In 3 - 5 Tagen wuchsen die Zellen wieder zu einem dichten Zellrasen und konnten infiziert oder weitergespalten werden.

2. Infektion der Zellen:

Zur Infektion wurde der Edmonston Stamm des Masernvirus verwandt. Die Virussuspension war 27 mal in einer 10^{-3}-Verdünnung auf Verozellen passagiert worden und besaß eine Infektiosität von ca. 3×10^7 p.f.u./ml. Die Zellen wurden mit jeweils mehr als 10 p.f.u./Zelle infiziert. Nach einer Absorptionszeit von 1h wurde die überständige Virussuspension entfernt und den Zellen Medium (2 % FKS), mit Antibiotika angereichert, angeboten.

3. Isotopenmarkierung der RNS:

Zu den in den einzelnen Versuchen angegebenen Zeitpunkten wurde das serumhaltige Medium von den infizierten Zellen entfernt und durch FKS-freies Medium ersetzt. Anschließend wurde Actinomycin D zugegeben, so daß in dem überständigen Medium eine Konzentration von 10 µg/ml herrschte und eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Darauf wurden ^{3}H-Uridin bzw. ^{3}H-Adenosin zugesetzt, bis eine Konzentration von 20 µC/ml (0,3 ml) erreicht war und für weitere 3 h bei 37° C inkubiert.

Die Markierung der 50 s RNS geschah in folgender Weise: 16 h post infectionem wurde das Medium entfernt und FKS-freies Medium, versetzt mit 25 µC/ml ^{3}H-Uridin (0,4 ml), zugefügt. Anschließend wurden die Zellen 8 h bei 37° C inkubiert, worauf die Extraktion und Reinigung der Nukleokapside erfolgte.

4. TCA-Fällung und Radioaktivitätsbestimmung:

Die Whatman Membranfilter GF/C wurden mit 5 ml TCA 10 %ig überschichtet. Dieser Lösung wurden jeweils 50 µl der Proben zugesetzt. Bei geringem RNS-Gehalt wurden vorher 50 µl einer Hefe-RNS-Lösung (100 µg/ml) zugegeben. Nach 10 min wurde das Lösungsmittel abgesaugt und der Rückstand je 2 mal mit 2 ml TCA 10 %ig und anschließend je 2 mal mit 3 ml Äthanol absolut. nachgewaschen. Darauf wurden die Filter in Zählbehälter gegeben und mindestens 24 h bei 37° C getrocknet. Nach Zugabe von 8,0 ml Bray-Lösung und Abkühlen auf 4° C im Kühlraum wurde die Radioaktivität im Packard Scintillationspectrometer bestimmt.

5. Isolierung und Fraktionierung intrazellulärer RNS

Zur RNS-Isolierung wurde das Medium dekantiert und die Zellen wurden mit NTE gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaliger Zugabe von je 5 ml NTE mit einem Gummiwischer aus der Roux-Flasche entfernt und 10 min bei 2000 - 3000 rpm und 4°C in der Heraeus Christ Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat in 0,8 ml Wasser suspendiert. Darauf blieben die Zellen 15 min auf Eis stehen und wurden dann in gequollenem Zustand in einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und das Lösungsmittel wurden in einer Heraeus Christ Zentrifuge 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde nach Abheben des Überstandes verworfen. Nach Zugabe von SDS 10 %ig bis zur 2 %igen Sättigung der Gesamtlösung wurde der Überstand 2 min auf 56°C und anschließend 2 min auf 37°C erhitzt. Die derart bereitete Lösung wurde sofort der Gradientenzentrifugation wie folgt unterworfen:
In einem Ultrazentrifugengläschen für den Rotor SW 27 wurde mit einem Gradientenmischer ein linearer Saccharosegradient von 30 % bis 15 % hergestellt. Die wässrigen Gradienten enthielten 0,1 % SDS. Nun wurden auf diese Gradienten 20 - 200 µl der RNS-Lösung pipetiert, worauf in einer L-2 Ultrazentrifuge Beckman mit dem Rotor SW 27 bei 20°C und 18000 rpm eine 16-stündige Zentrifugation erfolgte. Anschließend wurden die Gradienten mit einer Peristaltikpumpe vom Boden her entleert und fraktioniert. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde in Mikroquarzküvetten bei 254 nm in einem PMQ 2 Spektralphotometer Zeiss gemessen. Die Radioaktivität wurde, wie bei der TCA-Fällung beschrieben, bestimmt.

Erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung der RNS bei einem Experiment zu unterschiedlichen Zeitpunkten, so wurden die Zellkulturen auf Plaque-Testplatten (ø 20 mm) angelegt.

Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit ^{3}H-Uridin (2 µC/ml) mit und ohne Einwirkung von Actinomycin D markiert. Die Ernte erfolgte zu den unter Ergebnisse angegebenen Zeitpunkten, indem das überstehende Medium von den betreffenden Zellen abgehoben wurde. Darauf wurden die Zellen in 2,5 ml NTE, das 2 % SDS enthielt, suspendiert. Die einzelnen Proben wurden dann 10 min lang auf 56°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die Radioaktivität wurde, wie bei der TCA-Fällung beschrieben, bestimmt.

6. Isolierung und Fraktionierung intrazellulärer Strukturen

Zur Isolierung intrazellulärer Strukturen wurde das Medium dekantiert und die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummiwischer bei zweimaliger Zugabe von 10 ml PBS aus der Roux-Flasche entfernt und 10 bis 15 min bei 3000 rpm und 4°C mit der Heraeus Christ Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat in 0,5 ml RSB resuspendiert. Nachdem diese Suspension 20 min in Eiswasser gestanden war, wurden die Zellen im gequollenen Zustand mit dem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Darauf wurden die Zelltrümmer und das Lösungsmittel 15 min in der Heraeus Christ Zentrifuge bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und der Überstand in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde sofort der Gradientenzentrifugation unterworfen, der anderen Hälfte wurden vorher noch 0,15 ml einer 0,01 M EDTA-Lösung zugesetzt.

Anschließend wurde in einem Ultrazentrifugengläschen für den Rotor SW 41 mit einem Gradientenmischer ein linearer Sacharosegradient von 40 % - 15 % hergestellt und 20 - 100 µl Untersuchungsmaterial aufpipettiert. In einer L - 2

Ultrazentrifuge Beckman wurde mit dem Rotor SW 41 bei 20000 rpm und 4°C 90 min lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten mit einer Peristaltikpumpe vom Boden her ausgepumpt und fraktioniert. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde in Mikroküvetten bei 254 nm mit einem PMQ 2 Spektralphotometer Zeiss gemessen. Die Radioaktivität wurde, wie bei der TCA-Fällung beschrieben, bestimmt.

7. Ribonukleasebehandlung der RNS

Die entsprechenden Fraktionen radioaktiv markierter RNS wurden nach der Gradientenzentrifugation in 0,5 ml SSC Puffer suspendiert und mit 25 µg/ml Pankreas - bzw. T_1-Ribonuklease versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2,0 ml TCA 5 % wurde die Reaktion gestoppt und anschließend die verbliebene Radioaktivität bestimmt.

8. DNS-Nachweis

Die Proben wurden in 0,5 ml einer 0,3 N KOH suspendiert und 17 - 18 h bei 37°C inkubiert. Darauf wurden sie mit 0,5 ml 0,3 N HCl versetzt. Durch Zugabe von 2,0 ml TCA 10 % wurde die DNS gefällt und anschließend die verbliebene Radioaktivität, wie bei der TCA-Fällung beschrieben, bestimmt.

9. Chromatographische Untersuchung der Polynukleotidbildung

Bei diesen Untersuchungen wurden verschiedene Substanzen als Träger verwendet.

9.1. Träger: oligo d (T)-Zellulose

Eine Mischung von oligo d (T) und Zellulose im Verhältnis 1 + 9 wurde in 10 ml Aqua dest. steril. aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde in vorbereitete Pasteurpipetten als Säule gegeben und mit STES-Puffer äquilibriert. Die derart

präparierte Säule wurde mit einer Lösung der markierten RNS gelöst in STES-Puffer beschickt und mit STES-Puffer eluiert. Die gebundene RNA wurde anschließend mit TES-Puffer eluiert (2).

9.2. Träger: poly (U)-Sepharose

Die Trägersubstanz wurde bei Raumtemperatur in 1 M NaCl 30 - 45 min aufgequollen. Anschließend wurde die Suspension 3 - 5 mal mit 0,1 N NaCl gewaschen, in vorbereitete Pasteurpipetten als Säule gegeben und mit CSB-Puffer äquilibriert. Diese Säulen wurden mit markierter RNS gelöst in CSB-Puffer beschickt und CSB-Puffer eluiert. Darauf wurde mit EB-Puffer eluiert und die poly (A)-kettenhaltige RNA aufgefangen (25).

9.3. Träger: Nitrozellulose

Es wurden Nitrozellulosefilter von Milipore und Sartorius verwandt. Mit diesem Material als Träger wurde in der gleichen Art verfahren wie unter dem Träger oligo d (T)-Zellulose beschrieben (24).

10. Einwirkung der Polynukleotidphosphorylase auf virale RNS

Die entsprechenden Fraktionen radioaktiv markierter RNA wurden nach der Gradientenzentrifugation in 1,0 ml Enzympufferlösung suspendiert und bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden 0,1 ml Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und deren verbliebene Radioaktivität nach der unter TCA-Fällung beschriebenen Methode bestimmt (28,38).

11. Aminosäurenmarkierung

Die Verozellen wurden auf Petrischalen (ø 10,0 cm) gezüchtet und wie vorher beschrieben infiziert. 16 h post infectionem wurden 10 µg/ml Actinomycin D und 100 µg/ml Cordycepin bzw.

100 µg/ml Cycloheximid in einem aminosäurefreien Medium zugegeben. Jeweils in der letzten Stunde vor der Ernte wurde jede Kultur mit 4 µC/ml ^{14}C-Proteinhydrolysat versetzt. Die Proben wurden in stündlichen Abständen entnommen, indem jede Probe zunächst mit NTE von 0°C gewaschen wurde. Darauf wurden die Zellen mit NTE, die 2 % SDS enthielt, behandelt und die so erhaltenen Zellfragmente konnten gesammelt und 10 min lang auf 100°C erhitzt werden. Anschließend wurde die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

12. Behandlung der infizierten Zellen mit Cycloheximid und Cordycepin

Den Zellen wurden 16 h post infectionem Actinomycin D (10 µg/ml) und Cycloheximid (100 ug/ml) bzw. Cordycepin (100 µg/ml) angeboten. Nach 1 h wurden Substanzen aus dem Überstand entfernt und es erfolgte eine 3 stündige Markierung mit ^{3}H-Uridin bzw. ^{3}H-Adenosin bis zur Ernte.

C. ERGEBNISSE

1. Zeitlicher Verlauf der RNS-Synthese

Der zeitliche Verlauf der RNS-Synthese wurde mit Hilfe der ^{3}H-Uridin-Einlagerung untersucht. Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung des ^{3}H-Uridin-Einbaues in nicht infizierte und infizierte Verozellen bei An- oder Abwesenheit von Actinomycin D (10 µg/ml) sind in Abb. 1 dargestellt. Nach Zugabe von Actinomycin D war eine RNS-Synthese erst ab 4 Stunden post infectionem nachweisbar. Bei den infizierten Verozellen steigerte sich unter Einwirkung dieser Substanz im weiteren Verlauf die Syntheserate bis zu einem Maximum, das nach 16 bis 18 Stunden erreicht war, um in den folgenden 10 Stunden wieder abzufallen. Unter den gleichen Bedingungen ließ sich an den nicht infizierten Verozellen keine signifikante Steigerung der RNS-Synthese nachweisen. Bei den infizierten Verozellen steigerte sich ohne Einwirkung von Actinomycin D die Syntheserate ab 4 Stunden post infectionem in einem geringen Maße und erreichte schon nach 12 Stunden ein Maximum, um in den folgenden Stunden ebenfalls abzufallen. Unter den gleichen Bedingungen ließ sich an den nicht infizierten Verozellen keine signifikante Änderung der RNA-Syntheserate nachweisen. Somit verringerte sich in den infizierten Verozellen die RNA-Syntheserate ohne Einwirkung von Actinomycin D bereits zu einem Zeitpunkt, als die RNS-Synthese unter Einfluß von Actinomycin D ihren höchsten Wert noch nicht erreicht hatte. Demnach liegt der Zeitpunkt der maximalen Synthese virusspezifischer RNS in dem Zeitabschnitt des Rückganges der gesamten RNS-Synthese infizierter Zellen oder deutlich später.

Größte CPE und Infektivitätstiter wurden 24 Stunden post infektionem beobachtet. Damit erscheint der Zeitpunkt maximaler RNS-Synthese nach 2/3 des Zeitablaufes einer Viruswachstumsperiode. Dies Ergebnis entspricht Untersuchungen am Masernvirus (32) und am NDV (5).

Zeitlicher Verlauf der RNA-Synthese

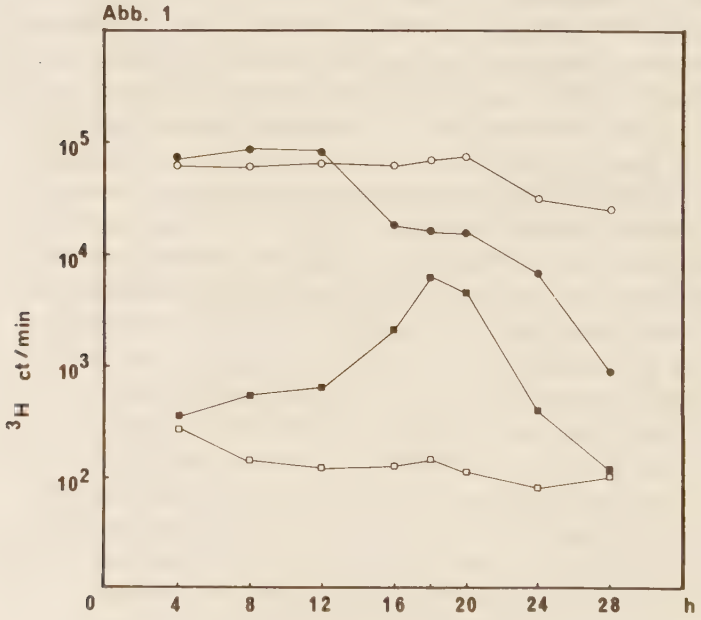


Abb. 1:

Symbole:

- ○: nicht infizierte Zellen
- □: nicht infizierte Zellen + Actinomycin D
- ●: infizierte Zellen
- ■: infizierte Zellen + Actinomycin D

Legende S. 19

Einlagerung von ^{3}H-Uridin in Verozellen nach Infektion mit Masernvirus unter Einwirkung von Actinomycin D und ohne Zugabe dieser Substanz.

Die Zellen wurden in den letzten 4 Stunden vor der Ernte 1 Stunde lang mit Actinomycin D behandelt und anschließend 3 Stunden lang mit ^{3}H-Uridin markiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in 4-stündlichen Intervallen post infektionem. Anschließend wurden die TCA-präcipitierbaren Anteile der Zellinhalte einer Radioaktivitätsbestimmung unterworfen, wie unter"Methoden"beschrieben.

2. Sedimentationsanalyse virusspezifischer RNS

Zur qualitativen und quantitativen Trennung unterschiedlicher Anteile masernspezifischer RNS wurde eine Sedimentationsanalyse mit Hilfe des Saccharosegadienten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 a + b dargestellt. Die RNS wurde mit ^{3}H-Uridin (Abb. 2 a) und ^{3}H-Adenosin (Abb. 2 b) markiert und 20 Stunden post infectionem geerntet. Sie sedimentierte in 4 Hauptbereichen. In der 48 s bis 50 s Region sedimentierte ein Anteil, welcher als neu synthetisiertes Virus-Genom (15,36) angesehen werden kann. Ein größerer Anteil der RNS sedimentierte in der 12 s bis 16 s Region und ein wesentlich geringerer in der 28 s bis 36 s Region, die viraler m-RNS entsprechen. Ein vierter Anteil fand sich in der 4 s Region. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Gemisch von virusspezifischer RNS und zellulärer RNS, da dieser Anteil auch in den nicht infizierten, mit Actinomycin D behandelten Zellen auftrat (Abb. 2 a). Bei der Markierung mit ^{3}H-Adenosin fanden sich entsprechende Ergebnisse bei etwas geringerer Radioaktivitätseinlagerung (Abb. 2 b).

Sedimentationsanalyse virusspezifischer RNS

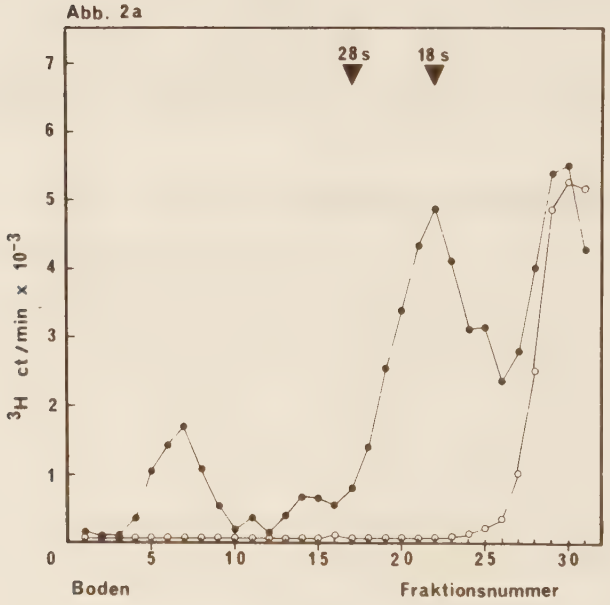


Abb. 2 a: Markierung mit ^{3}H-Uridin

Symbole:

- ●: TCA-präzipitierbare Radioaktivität in den infizierten Zellen.
- ○: TCA-präzipitierbare Radioaktivität in den nicht infizierten Zellen nach Actinomycin D-Behandlung und Markierung mit ^{3}H-Uridin

Legende S. 22

Sedimentationsanalyse virusspezifischer RNS

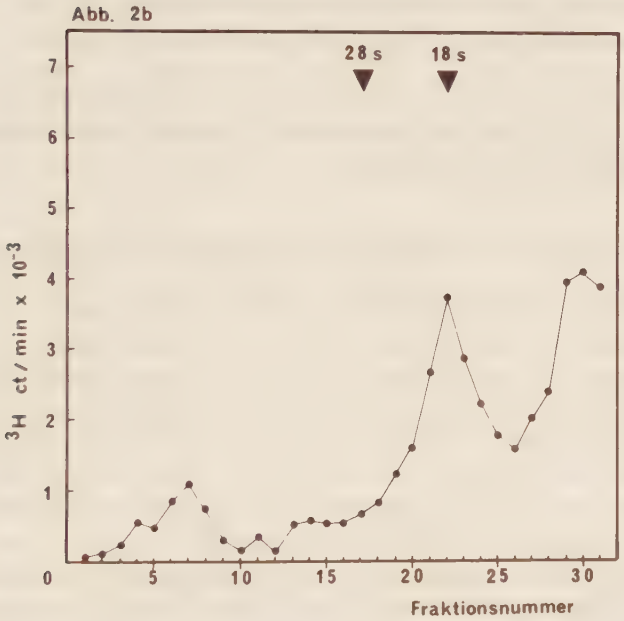


Abb. 2 b: Markierung mit ^{3}H-Adenosin

Symbole:

●: TCA-präzipitierbare Radioaktivität in den infizierten Zellen

Legende S. 22

Unter der Einwirkung von Actinomycin D wurde die intrazelluläre RNS zwischen der siebzehnten und zwanzigsten Stunde post infectionem mit ^{3}H-Uridin bzw. ^{3}H-Adenosin markiert. Diese RNS wurde, wie unter Methoden beschrieben, isoliert und mit Hilfe des Sacharosegradienten fraktioniert. Gleiche Mengen (0,05 ml) jeder Fraktion wurden mit TCA gefällt und der Radioaktivitätsbestimmung unterworfen.

Die Pfeile stellen die Sedimentationspositionen der Verozellen 28 s RNS und der ribosomalen 18 s RNS nach Eichung durch Absorption bei 254 nm dar.

3. Nachweis der poly (A)-Ketten in virusspezifischer RNS

Der Nachweis von poly (A)-Ketten, die an virusspezifische RNS angelagert sind, erfolgte durch die Untersuchung des Resistenzverhaltens virusspezifischer RNS gegen Pankreas- und T_1-Ribonuklease. Diese Versuche erfolgten in Anlehnung an Untersuchungen von Weiss und Bratt (1974) (40). Ihren s-Regionen entsprechend wurden die mit ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenosin markierten Anteile virusspezifischer RNS vereinigt und, wie in Tabelle 1 aufgezeigt, behandelt. Die 12 s bis 26 s RNS erschien einsträngig, da ihr gesamtes ^{3}H-Uridin durch die Reaktion mit den Ribonukleasen abgespalten wurde. Dagegen war die mit ^{3}H-Adenosin markierte RNS der 12 s bis 26 s Region zu ca. 14 % gegen die Ribonukleasen nach der Denaturierung resistent, was auf die Anwesenheit von poly (A)-Ketten hinweist. Ein ähnliches Verhalten zeigten die mit ^{3}H-Adenosin markierten RNS in der 28 s bis 36 s Region. Die geringe Resistenz der entsprechend mit ^{3}H-Uridin markierten RNS läßt vermuten, daß Doppelstrangstrukturen in diesem Bereich anzutreffen sind. Dieses entspricht Befunden, die an Paramyxovirus infizierten Zellen gemacht wurden. Dort konnten zweisträngige Moleküle in der 35 s Region nachgewiesen werden (4,12). Das Resistenzverhalten des mit ^{3}H-Adenosin markierten Materials der 50 s Region gegenüber Ribonukleasen,

müßte poly (A)-Ketten in dieser Region anzeigen. Die 50 s RNS gereinigter Masernvirusnukleokapside enthält jedoch keine poly (A)-Ketten (18), was Untersuchungen an Paramyxoviren und Rhabdoviren (27) entspricht. Obwohl die mit ^{3}H-Uridin markierte RNS der 50 s Region fast vollständig von den Ribonukleasen aufgelöst wurde, konnte das Auftreten lose gebundener replikativer und transscriptiver Strukturen in diesem Bereich nicht ausgeschlossen werden. Derartige Ketten haben wahrscheinlich eine ähnliche Struktur wie die poly (A)-Ketten, die zur RNS der 12 s bis 36 s Region gehören. Ähnliche Ergebnisse wurden über die RNS des NDV beschrieben (40).

Die Abwesenheit von DNS konnte in allen s-Regionen durch die Behandlung mit Alkalilösungen nachgewiesen werden.

Tabelle 1

Relative Sensibilität masernvirusspezifischer RNS gegen RN-asen.

Maßeinheit: % nicht aufspaltbare RNS

	^{3}H-Uridin			^{3}H-Adenosin		
	12-26s	28-36s	50s	12-26s	28-36s	50s
Pankreas-, T_1-RN-ase (1)	2,8	6,8	6,1	15,0	16,3	8,6
RN-asen nach Denaturierung (2)	0,0	0,12	0,03	14,2	10,4	4,3
0,3 N KOH (3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

(1): Pankreas-Ribonuklease (25 µg/ml), + T_1-Ribonuklease (4 µg/ml) Einwirkungszeit 30 min bei 37°C.

(2): Die Proben wurden mit 0,001 m Tris-HCl (pH 7,4), welches 0,005 % SDS enthielt, versetzt und 4 min auf 100°C erhitzt.

(3): Die Proben wurden 17 - 18 Stunden auf 37°C erhitzt.

4. Chromatographische Untersuchung der Polynukleotidbindung masernspezifischer RNS

Die Untersuchung der Bindungsverhältnisse zwischen den poly (A)-Ketten und der RNS der 12 s bis 36 s Region wurde mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Ungefähr 45 - 47 % der gesamten RNS konnten an oligo d(T)-Zellulose bzw. poly(U)-Sepharose 4 B gebunden werden. Die Versuche, eine konstante Menge RNS an nicht modifiziertes Zellulosenitrat zu binden, verliefen erfolglos. Die quantitative Ausbeute schwankte dort unter konstanten Versuchsbedingungen zwischen 45 und 75 %. Die Tatsache, daß die poly (A)-Ketten Unterschiede in ihrer Größe (37) und ihrer Bindungsspezifität (14) aufweisen, läßt den Schluß zu, daß ca. die Hälfte der RNS-Moleküle der 12 s bis 36 s Region poly (A)-Ketten enthalten, die genügend lang sind, um an oligo d(T)-Zellulose bzw. poly(U)-Sepharose gebunden zu werden.

Tabelle 2

Chromatographische Untersuchung der poly (A)-RNS

Stationäre Phase	% gebundene RNS
oligo d(T)-Zellulose	44 - 47 %
poly(U)-Sepharose 4 B	45 - 47 %
Nitrozellulosefilter: a. Millipore b. Satorius	Bindungsfähigkeit schwankte

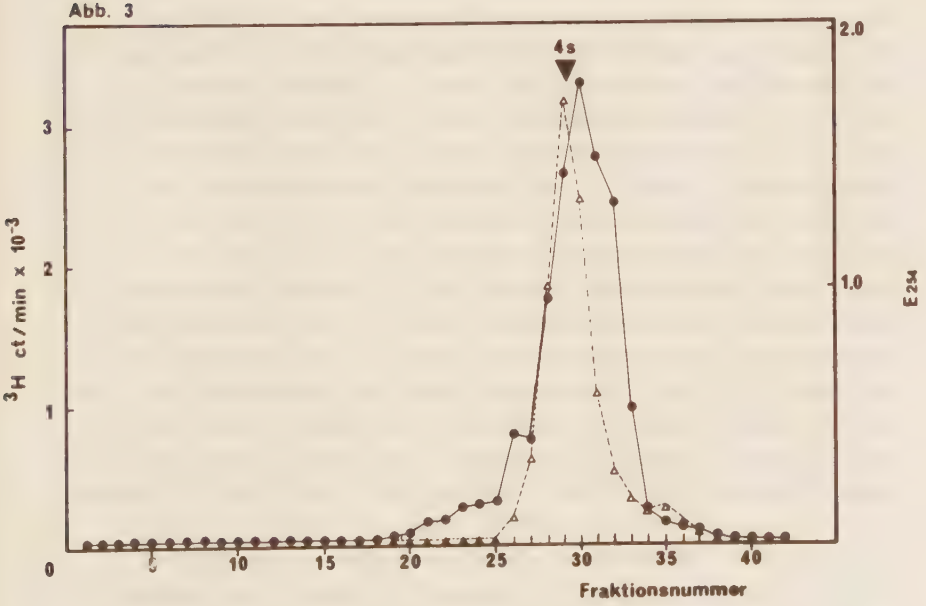
Als Untersuchungsmaterial diente 12 s bis 36 s RNS des Masernvirus.

5. Größe der poly (A)-Ketten

Um die Größe der poly (A)-Ketten zu bestimmen, die an die RNS der 12 s bis 36 s Region gebunden ist, wurden die mit ^{3}H-Adenosin markierten Proben der Einwirkung von Pankreas- und T_1-Ribonuklease ausgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37° C wurden die Proben auf einen Saccharosegradienten gegeben. Als Eichsubstanz diente 4 s tRNS von E. coli. Wie Abb. 3 zeigt, sedimentierte der größte Teil der poly (A)-Ketten homogen und etwas langsamer als die Vergleichssubstanz. Der Rest (10 - 15 %) der radioaktiv gekennzeichneten Testsubstanz sedimentierte in unterschiedlicher Schichtung oberhalb der Vergleichssubstanz.

Größe der poly (A)-Ketten

Abb. 3



Symbole:

●: ^{3}H-Adenosin c.p.m.

▲: O.D.$_{254}$ der 4 s tRNS von E. coli

Legende S. 26

Die Untersuchung der poly (A)-Ketten, die an die 12 s bis 36 s RNS des Masernvirus angelagert ist, erfolgte mit Hilfe des Sacharosegradienten. Die RNS wurde mit ^{3}H-Adenosin markiert und, wie unter "Methoden" beschrieben, isoliert und fraktioniert. Wie im gleichen Abschnitt beschrieben, wurden die Proben mit Ribonukleasen behandelt, die in SSC-Puffern gelöst waren. Gleiche Mengen (0,20 ml) wurden jeder Probe entnommen und deren TCA-präzipitierbare Radioaktivität bestimmt. Die 4 s tRNS von E. coli wurde unter gleichen Bedingungen gefällt. Die quantitative Bestimmung erfolgte hier aber durch Absorptionsmessung der einzelnen Fraktionen bei 254 nm.

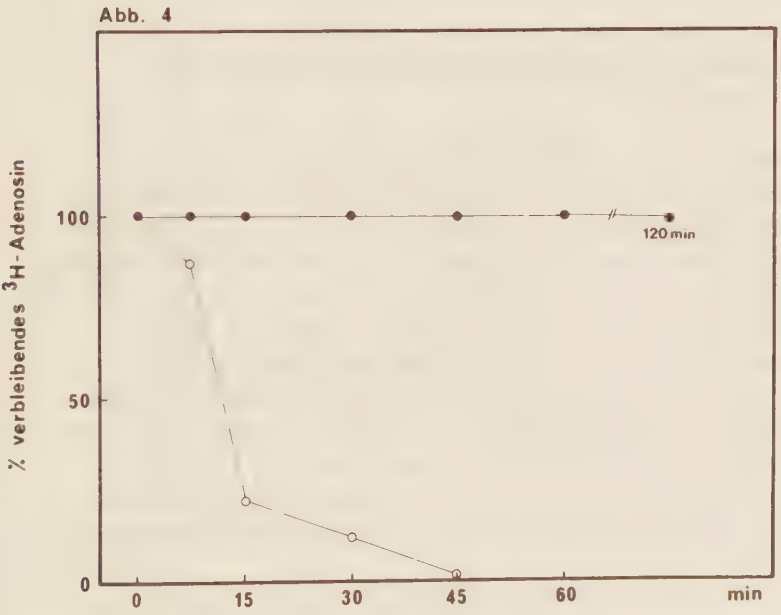
6. Bestimmung der Bindungsstelle der poly (A)-Ketten an die virusspezifische RNS

Um die Bindungsstelle der poly (A)-Ketten an die mRNS zu bestimmen, hat sich Polynukleotidphosphorylase als Reagenz zur selektiven Aufspaltung der poly (A)-Ketten bewährt (38,28). Dieses Enzym phosphorylysiert die RNS, beginnend am 3' Ende in Richtung des 5' Ende, wobei die Hydroxylgruppen des 3' Ende nach der Reaktion unsubstituiert verbleiben. Die poly (A)-Ketten wurden von der RNS der 12 s bis 36 s Region abgetrennt und gereinigt, wie oben beschrieben. Anschließend wurden sie der Phosphorylysierung unterworfen, und es konnte nach 30 bis 45 min eine 100%ige Aufspaltung festgestellt werden (Abb. 4). Im Gegensatz hierzu konnte die poly (A)-kettenhaltige RNS, die vorher an oligo d(T)-Zellulose gebunden werden konnte, durch das gleiche Enzym binnen 120 min nicht angegriffen werden. Diese Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß diese poly (A)-Ketten, falls sie am 3' Ende angelagert sind, in irgend einer Weise von den funktionsfähigen Molekülen geschützt sein müssen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Sheldon et al. (38). Diese Autoren wiesen nach, daß die poly (A)-Ketten, die der mRNA von HeLa-Zellen und des Vacciniavirus

entstammen, nicht gegen diese Polyribonuklease resistent seien. Den vorgelegten entsprechende Ergebnisse wurden über die 18 s mRNS des Sendaivirus gefunden (28), und es erscheint als wahrscheinlich, daß die poly (A)-Ketten durch die Sekundärstruktur der RNS-Moleküle geschützt sind.

Wirkung der Polynukleotidphosphorylase auf die 12 s bis 36 s RNS des Masernvirus

Abb. 4:



Symbole:

●: 12 s bis 36 s poly (A)-Ketten, die an RNS gebunden sind

○: poly (A)-Ketten der 12 s bis 36 s RNS

Legende S. 28

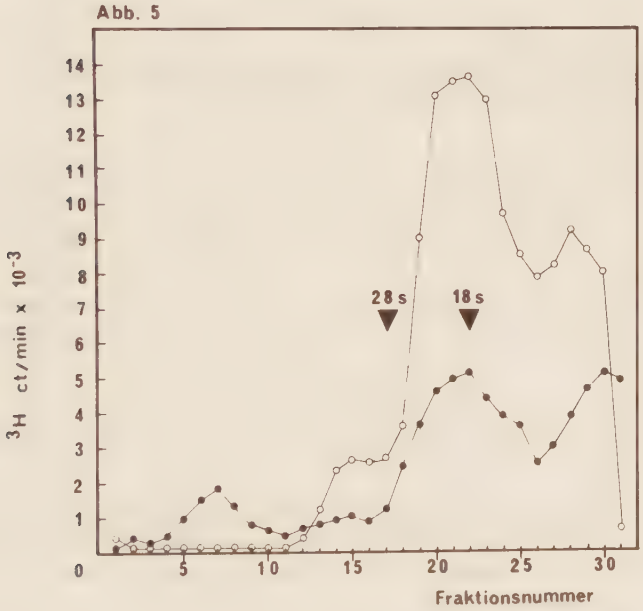
Die mit ^{3}H-Adenosin markierte 12 s bis 36 s RNS wurde, wie unter"Methoden"beschrieben, gereinigt. Nach der Fällung mit Äthanol erfolgte die Reinigung der poly (A)-kettenhaltigen RNS chromatographisch, wobei oligo d(T)-Zellulose als Träger diente. In einem zweiten Versuch wurden die poly (A)-Ketten der 12 s bis 36 s RNS der Einwirkung von Ribonukleasen ausgesetzt und mit Hilfe des Saccharosegradienten gereinigt. Beide Untersuchungsmaterialien wurden nun der Polynukleotidphosphorylase ausgesetzt, wie unter"Methoden"beschrieben. In Abständen von 15 min wurden Proben entnommen und der verbliebene Prozentsatz an TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt.

7. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virus-spezifischer RNS

Zur Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid auf die folgenden RNS-Synthesen wurden Saccharosegradienten durchgeführt. Die Markierung erfolgte mit ^{3}H-Uridin. Sämtlichen Proben wurden 10 µg/ml Actinomycin D zugesetzt. Die Bestimmung erfolgte ohne und unter Zugabe von 100 µg/ml Cycloheximid. Bei den Zellen, die nur mit Actinomycin D behandelt wurden, sedimentierte die RNS in folgenden Bereichen: 12 s bis 36 s, 28 s bis 36 s und 50 s (Abb. 5). Die Behandlung mit Cycloheximid bewirkte eine fast dreifach erhöhte Radioaktivitätseinlagerung in den Sedimentationsregionen von 12 s bis 36 s und von 28 s bis 36 s. Weiterhin wurde eine vollständige Blockierung der RNS-Synthese in der 50 s Region festgestellt. (Abb. 5).

Wirkung von Cycloheximid auf die RNS-Synthese des Masernvirus

Abb. 5:



Symbole:

●: ^{3}H-Uridin, c.p.m. ohne Cycloheximid

○: ^{3}H-Uridin, c.p.m. mit Cycloheximid

Die Pfeile geben die Sedimentationspositionen der 28 s und der 18 s RNS von Verozellen an. Diese Bestimmung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 254 nm.

Legende S. 30

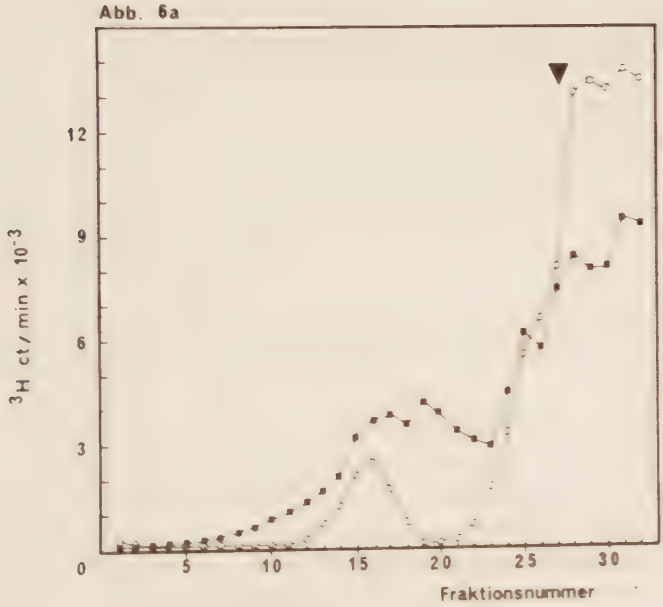
Intrazelluläre RNS wurde unter Einwirkung von Actinomycin D mit ^{3}H-Uridin von der siebzehnten bis zur zwanzigsten Stunde post infectionem markiert. Die eine Hälfte der Proben wurde mit Cycloheximid behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Gleich große Proben (0,05 ml) wurden von jeder Fraktion entnommen, mit TCA gefällt und anschließend der Radioaktivitätsbestimmung unterworfen.

8. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer intrazellulärer Strukturen

Zur Untersuchung der RNS, die sich in den cytoplasmatischen Extrakten befindet, wurde eine Präparation und Fraktionierung mit Hilfe des Saccharosegradienten durchgeführt. Jeder cytoplasmatische Extrakt wurde in zwei Teile aufgeteilt. Eine Probe wurde sofort auf einen 15 - 40-%igen Sacharosegradienten gegeben, während die andere zuvor mit EDTA behandelt wurde. Die typischen Radioaktivitätsprofile sind in der Abb. 6 a und 6 b dargestellt. Infizierte Zellen, die nur mit Actinomycin D behandelt wurden, beinhalten Polyribosomen, die bis zum 300 s Bereich hin sedimentierten (Abb. 6 a). Nach der Behandlung mit EDTA konnte RNS im Bereich um 230 s nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in diesem Material eine RNS gefunden, die in der 50 s Region sedimentierte, wobei es sich um neu synthetisierte Virus-Nukleokapside handelt. Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid bewirkte eine dreifache Erhöhung der Radioaktivitätseinlagerung im Bereich der Polyribosomen und eine Steigerung ihrer Sedimentationsrate (Abb. 6 b). Die Analyse der mit EDTA behandelten Extrakte zeigte, daß in den mit Cycloheximid behandelten Zellen keine Nukleokapside synthetisiert wurden. Das Fehlen der Nukleokapside deckt sich mit früheren Ergebnissen, bei denen festgestellt wurde, daß diese Substanz die Genomsynthese unterbindet.

Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer Strukturen

Abb. 6 a:



Symbole:

■: ^{3}H-Uridin c.p.m. ohne EDTA-Einwirkung

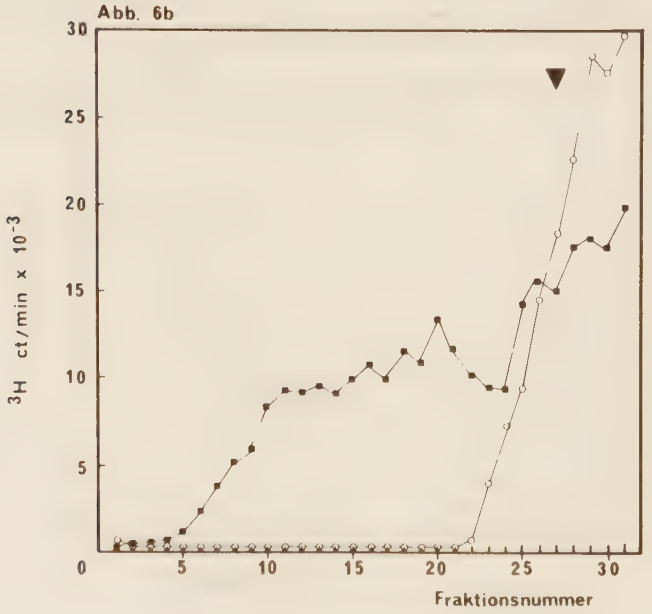
○: ^{3}H-Uridin c.p.m. unter EDTA-Einwirkung

Die Position der Ribosomenmonomere wurde mit einer Absorptionsmessung bei 254 nm bestimmt. Diese sedimentierten an der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle.

Legende S. 33

Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer Strukturen

Abb. 6 b:



Symbole:

■: ^{3}H-Uridin c.p.m. ohne EDTA-Einwirkung

o: ^{3}H-Uridin c.p.m. unter EDTA-Einwirkung

Die Position der Ribosomenmonomere wurde mit einer Absorptionsmessung bei 254 nm bestimmt. Diese sedimentierten an der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle.

Legende S. 33

Die intrazellulären Strukturen wurden unter der Einwirkung von Actinomycin D zwischen der siebzehnten und zwanzigsten Stunde post infectionem mit ^{3}H-Uridin markiert. Die eine Hälfte der Proben wurde zusätzlich mit Cycloheximid behandelt (Abb. 6 b), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (Abb. 6 a). Die cytoplasmatischen Extrakte wurden, wie unter "Methoden" beschrieben, aufbereitet und in jeweils zwei gleich große Portionen geteilt. Hiervon wurde wiederum je die eine Hälfte mit 0,01 m EDTA versetzt, während die andere Hälfte dieser Behandlung nicht unterzogen wurde. Unmittelbar darauf wurden die Extrakte auf einem linearen Sacharosegradienten zentrifugiert und fraktioniert, wie unter "Methoden" beschrieben. Von gleichen Mengen (0,05 ml) jeder Fraktion wurde die Radioaktivität der TCA-präzipitierbaren Anteile bestimmt.

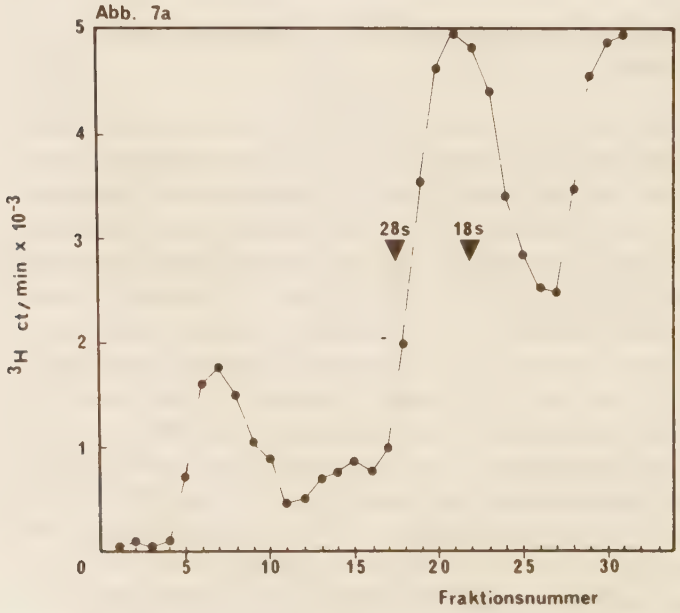
9. Die Wirkung von Cordycepin auf die virusspezifische RNS-Synthese

Zur Untersuchung der virusspezifischen RNS-Synthese unter der Einwirkung von Cordycepin wurde eine Präparation und Fraktionierung mit Hilfe des Saccharosegradienten durchgeführt. In Abb. 7 a und 7 b ist das Sedimentationsverhalten der virusspezifischen RNS-Synthese in Verozellen dargestellt. Sämtliche Zellen wurden mit Actinomycin D behandelt, und die Markierung erfolgte mit ^{3}H-Uridin. Das Zellmaterial wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt, worauf die eine Hälfte mit 100 µg/ml Cordycepin behandelt wurde (Abb. 7 b), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (Abb. 7 a). Bei den nur mit Actinomycin D behandelten Zellen wurde in folgenden Regionen RNS nachgewiesen: 12 s bis 26 s, 28 s bis 36 s und 50 s. Nach der Zugabe von Cordycepin war die RNS-Sedimentation in der 12 s bis 36 s Region um ca. 40 % reduziert und in der 50 s Region völlig ausgeblieben. In vier nur individuell unterschiedlich durchgeführten Versuchen

betrug der Rückgang in der 12 s bis 36 s Region jeweils zwischen 40 und 42 %. Bei diesen Versuchen konnte die RNS-Synthese in der 50 s Region nicht immer vollständig unterbunden werden. Eine über 90%ige Verminderung wurde zumindest in jedem Versuch erreicht, wobei die Markierung mit ^{3}H-Uridin oder ^{3}H-Adenosin erfolgte.

Die Wirkung von Cordycepin auf die virusspezifische RNS-Synthese

Abb. 7 a



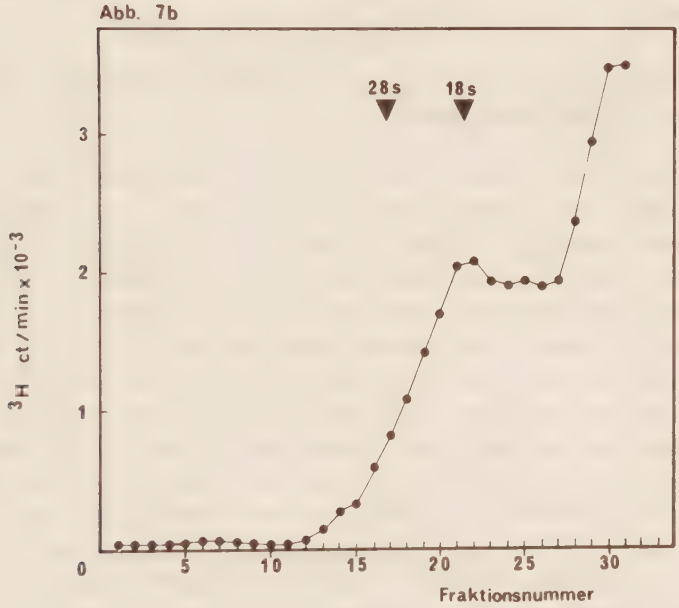
Symbole:

●: ^{3}H-Uridin c.p.m.

Legende S. 36

Die Wirkung von Cordycepin auf die virusspezifische RNS-Synthese

Abb. 7 b:



Symbole:

●: ^{3}H-Uridin c.p.m.

Die Pfeile stellen die Sedimentationspositionen der 28 s und 18 s ribosomalen RNS von Verozellen dar. Ihre Positionen wurden durch eine Absorptionsmessung bei 254 nm bestimmt.

Legende S. 36

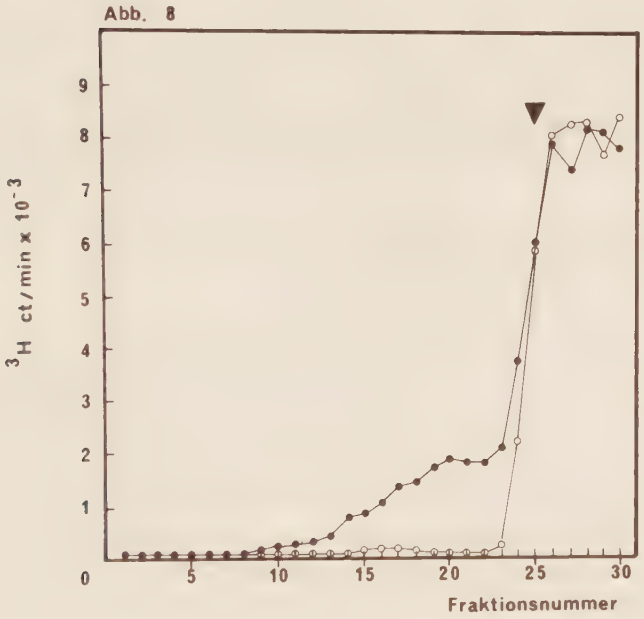
Intrazelluläre RNS wurde mit ^{3}H-Uridin unter der Einwirkung von Actinomycin D zwischen der 17. und 20. Stunde post infectionem markiert. Die eine Hälfte der Proben wurde mit Cordycepin versetzt (Abb. 7 b), die andere dagegen nicht (Abb. 7 a). Wie unter "Methoden" beschrieben, wurde die RNA isoliert und fraktioniert. Von jeder Probe wurden jeweils 0,05 ml entnommen und deren TCA-präzipitierbare Radioaktivität bestimmt.

10. Die Wirkung von Cordycepin auf die Synthese virusspezifischer intrazellulärer Strukturen:

Diese Untersuchung wurde, wie unter "Methoden" beschrieben, mit Hilfe des Saccharosegradienten durchgeführt. Das Sedimentationsverhalten der intrazellulären Strukturen, die unter der Einwirkung von Cordycepin synthetisiert wurden, ist in der Abb. 8 dargestellt. Sämtliche Zellen wurden mit Actinomycin D behandelt, und die Markierung erfolgte mit ^{3}H-Uridin. Die Behandlung der infizierten Zellen mit Actinomycin D und deren Extrakte mit bzw. ohne EDTA führte zu ähnlichen Ergebnissen wie bei der Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese virusspezifischer Strukutren (siehe Abb. 6 a). Cordycepin senkte die Radioaktivitätseinlagerung in die Polyribosomen und deren Sedimentationsrate signifikant (Abb. 8). Die Behandlung der Extrakte mit EDTA zeigte, daß die Synthese der Virusnukleokapsidstrukturen nahezu vollständig unterbunden wurde (Abb. 8).

Die Wirkung von Cordycepin auf die Synthese virus-spezifischer intrazellulärer Strukturen

Abb. 8:



Symbole:

●: ^{3}H-Uridin c.p.m. ohne EDTA-Einwirkung

○: ^{3}H-Uridin c.p.m. unter EDTA-Einwirkung

Legende S. 38

Die Position der Ribosomenmonomere wurde mit einer Absorptionsmessung bei 254 nm bestimmt. Diese sedimentierten an der mit dem Pfeil angezeigten Stelle.

Die intrazellulären Strukturen wurden unter der Einwirkung von Actinomycin D und Cordycepin mit ^{3}H-Uridin zwischen der 17. und 20. Stunde post infectionem markiert. Wie unter "Methoden" beschrieben, wurden die cytoplasmatischen Extrakte aufbereitet und fraktioniert. Von jeder Fraktion wurden jeweils 2 Proben entnommen. Hiervon wurde die eine Hälfte mit EDTA behandelt, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Anschließend wurde die Radioaktivität der TCA-präszipitierbaren Anteile bestimmt.

11. Die Wirkung von Cycloheximid und Cordycepin auf den Gehalt an poly(A)-Ketten der viralen mRNS

Um festzustellen, in welchem Ausmaß diese Substanzen auf die Polyadenylierung der 12 s bis 36 s mRNS einwirken, mußten zwei Experimente durchgeführt werden. Wie unter "Methoden" beschrieben, wurde die mit ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenosin markierte RNS nach Durchführung eines Saccharosegradienten gesammelt. Anschließend wurde dieses Material, wie vorher beschrieben, mit Pankreas- und T_1-Ribonuklease behandelt (18). Die mit ^{3}H-Adenosin markierte RNS der 12 s bis 36 s Redion wies eine 16 %ige Resistenz gegen die RNase-Behandlung auf (siehe Tabelle 3). Dieses Verhalten steht im Zusammenhang mit dem Auftreten von poly(A)-Ketten an dieser RNS (18). Unter Einwirkung von Cordycepin zeigte sich bei der gleichen RNS eine 9 bis 11 %ige Resistenz gegen die RNasen (Tabelle 3). Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß Cordycepin eine Verminderung des Gehaltes an poly(A)-Ketten bewirkt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung von Cycloheximid erzielt (Tabelle 3).

In einem zweiten Versuch wurde die Bindungsfähigkeit der 12 s bis 36 s RNS an oligo d(T)-Zellulose untersucht. Unter der Einwirkung von Actinomycin D wurden 47 % der 12 s bis 36 s RNS an oligo d(T)-Zellulose gebunden (Tabelle 3). Nach zusätzlicher Gabe von Cycloheximid bzw. Cordycepin wurden nur noch 26 % bzw. 27 % der mRNS gebunden.

Tabelle 3

Sensibilitätsverhalten der 12 s bis 36 s RNS des Masernvirus gegen Ribonukleasen und prozentuale Bindungsfähigkeit an oligo d(T)-Zellulose

RNS	% (c.p.m.) Resistenz gegen Ribonukleasen (1)	
	^{3}H-Uridin	^{3}H-Adenosin
Act. D	2,3	15,8
Act. D + Cycloheximid	1,7	11,4
Act. D + Cordycepin	1,4	9,3

RNS	% gebunden an oligo d(T)-Zellulose (2)
Act. D	47
Act. D + Cycloheximid	27
Act. D + Cordycepin	26

(1): Die Fraktionen der einzelnen Gradienten wurden gesammelt und mit Pankreas- und T_1-Ribonuklease behandelt, wie im Text beschrieben.

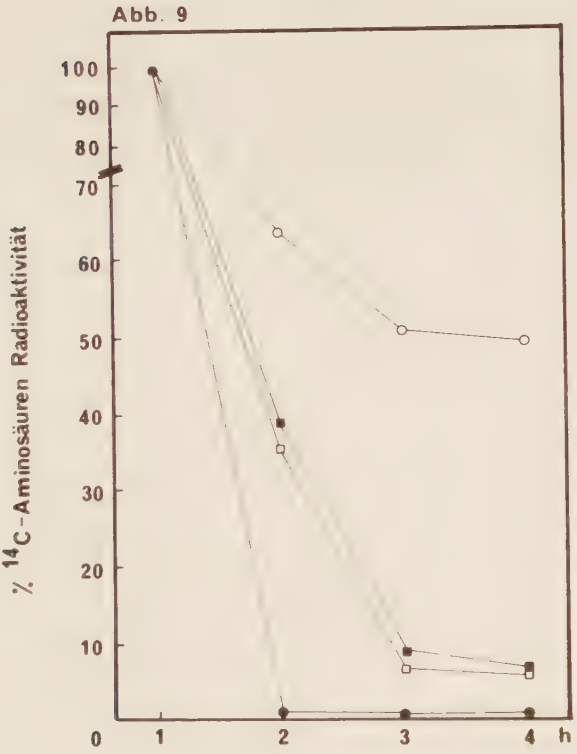
(2): Gleiche, mit ^{3}H-Uridin markierte Proben wurden, wie im Text beschrieben, chromatographiert. Als Träger diente oligo d(T)-Zellulose.

12. Die Wirkung von Cordycepin und Cycloheximid auf die Proteinsynthese.

Cordycepin unterbindet in ähnlicher Weise wie Cycloheximid die RNS-Synthese des Masernvirus in der 50 s Region. Diese Beobachtung gab Anlaß zu der Vermutung, daß Cordycepin ebenso die Proteinsynthese beeinflußt. Aus diesem Grunde wurde der Einbau markierter Aminosäuren in infizierte Zellen untersucht. Während des Zeitraumes der maximalen RNS-Synthese,d.h. ab der 17ten Stunde post infektionem, wurden den Zellen ^{14}C-Aminosäuren jeweils in der letzten Stunde vor der Ernte zur Proteinsynthese angeboten. Gleichwertige Kulturen wurden jeweils mit und ohne Actinomycin D behandelt. Das Gleiche gilt für Cordycepin bzw. Cycloheximid. Die Proben wurden in stündlichen Abständen entnommen (Abb. 9, O h = 17te h post infektionem). Innerhalb der ersten beiden Stunden verminderte Cordycepin den Einbau der ^{14}C-Aminosäuren um mehr als 60 %, ohne daß hierbei Actinomycin D einen Einfluß ausübte. 3 Stunden bzw. 4 Stunden nach Zugabe des Cordycepins wurden weniger als 10 % der Radioaktivität eingebaut. Von Interesse ist noch die Beobachtung, daß Actinomycin D 4 Stunden nach der Zugabe die Einlagerung der ^{14}C-Aminosäuren um 50 % verminderte. Weiterhin bewirkte Cycloheximid schon nach einer Stunde eine um mehr als 99,5 %ige Blockierung des Radioaktivitätseinbaues.

Die Wirkung von Cordycepin und Cycloheximid auf den Aminosäureneinbau in Masernvirus infizierte Zellen

Abb. 9:



Symbole: Legende S. 42

○: Actinomycin D

●: Actinomycin D + Cycloheximid

□: Actinomycin D + Cordycepin

■: Cordycepin

Die infizierten Zellen wurden ab der 17ten Stunde post infectionem in der letzten Stunde vor der Ernte mit ^{14}C-Proteinhydrolysat markiert. Den einzelnen Ansätzen wurden die oben aufgeführten Substanzen zugefügt. Die Proben wurden in stündlichen Abständen ab der 18ten h post infectionem entnommen und deren TCA-präzipitierbare Radioaktivität bestimmt. Als Eichmarke für den 100 %igen Einbau wurde die ^{14}C c.p.m. angenommen, die zwischen der 17ten und 18ten Stunde post infectionem unter der Einwirkung von Actinomycin D gemessen wurden.

D. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit biochemischen Eigenschaften der RNS des Masernvirus. Die RNS-Biosynthese wurde in Verozellen unter der Einwirkung von Actinomycin D und unter Beachtung der Bedingung des "Ein-Schritt-Wachstums" durchgeführt. Die zum Zeitpunkt der maximalen RNS-Synthese gewonnene neu synthetisierte virale RNS konnte mit Hilfe des Saccharosegradienten in 4 unterschiedliche Anteile aufgetrennt werden, die in folgenden Bereichen sedimentierte: 4 s, 12 s bis 26 s, 28 s bis 36 s und bei 50 s. Die RNS des 50 s Bereiches muß als neu synthetisiertes Virusgenom angesehen werden. Bis heute konnte keine schlüssige Begründung für das Resistenzverhalten der mit ^{3}H-Adenosin markierten 50 s RNS gegen Ribonukleasen gegeben werden. Weiss & Bratt (1974) (40) beschrieben in einer Veröffentlichung über das NDV im 50 s Bereich doppelstängige Strukturen, die entweder transskriptive oder replikative Zwischenstufen der RNS-Biosynthese darstellen. Bezieht man dieses Untersuchungsergebnis auf das Masernvirus, so müßte man erwarten, daß vor allem transskriptive Strukturen im 50 s Bereich angelagert sind, wenn die poly (A)-Ketten dort ein Resistenzverhalten gegen Ribonukleasen aufweisen. Auch dürfte dieses transskriptive Material chemisch recht lose an die 50 s RNS gebunden sein, da die 50 s RNS nach der Markierung mit ^{3}H-Uridin durch Ribonukleasen vollständig aufgelöst wurde.

Die 12 s bis 36 s RNS kann analog zu den Paramyxoviren als eine neu synthetisierte mRNS aufgefaßt werden. Diese Vorstellung wurde mit zwei Beweisen belegt. Zum ersten erfolgte der Nachweis von Polyribosomen, die an diese RNS angelagert waren und mit EDTA abgetrennt werden konnten. Zum zweiten wurde gezeigt, daß die poly (A)-Ketten am

3'-Ende der RNS angelagert waren. Der eindeutigste Nachweis müßte in einem Zellen-ungebundenen System durchgeführt werden, in dem man mit dieser 12 s bis 36 s RNS unter geeigneten Bedingungen eine Masernvirus -mRNS-Synthese ermöglicht. Derartige Versuche wurden am NDV und Sendaivirus erfolgreich durchgeführt (3,21). Somit führt das Masernvirus die Translation mit einer komplementären RNS durch, entsprechend dem Syntheseweg anderer Paramyxoviren und Rhabdoviren (21,23).

Die Größe der poly (A)-Ketten wurden mit Hilfe des Saccharosegradienten untersucht. Fast 80 % der poly (A)-Ketten sedimentierten geringfügig langsamer als die Vergleichssubstanz 4 s tRNS von E. coli. Diese Ketten bestehen somit aus ca. 70 Nukleotiden mit einem Molekulargewicht (Mol.gew.) von ca. 25.000. Die verbliebenen 20 % sedimentierten in einem Bereich von 6 s bis 7 s, was ungefähr einem Mol. gew. von 55.000 entspricht. Demnach bestanden die poly (A)-Ketten aus ca. 70 bis 180 Nukleotiden. Gorski et al. (1974) (14) und Sheiness & Darnell (1973) (37) wiesen nach, daß sich die poly (A)-Ketten mit ihrer mRNS in vivo in einem ständigen Auf- und Abbau befinden. Aus diesem Grunde konnte bei dem Masernvirus ein ähnliches Ergebnis erwartet werden, zumal Pridgen & Kingsbury (1972) (34) und Weiss & Bratt (1974) (40) am Paramyxovirus und Moyer et al. (1975) (29) an Rhabdoviren Größenunterschiede der entsprechenden poly (A)-Ketten festgestellt haben. Um nachzuweisen, daß die poly (A)-Ketten am 3'-Ende der Moleküle angelagert waren, wurden diese mit Polynukleotidphosphorylase von der Virus-RNS abgespalten. Die funktionsfähigen Anteile der mRNS wurden jedoch von diesem Enzym nicht angegriffen, was darauf hindeutet, daß diese poly (A)-Ketten durch die Sekundärstruktur der RNS geschützt sind. Entsprechendes wurde vom Sendaivirus festgestellt (28). Dagegen konnte an HeLa-Zellen und am Vacciniavirus beobachtet werden, daß die analogen poly (A)-Ketten dort nicht durch die Sekundärstruktur der RNS geschützt sind (38). Aus diesem Grunde ist

dieses Phänomen heute noch nicht als ein Charakteristikum der Paramyxoviren anzusehen.

Es ist noch unbekannt, zu welchem Zeitpunkt und nach welchem Mechanismus die poly (A)-Ketten bei der Transskription angelagert werden. Einerseits könnte eine Virustransskriptase diese Reaktion katalysieren, andererseits aber auch eine poly (A)-Polymerase einwirken.

Die Masernvirus mRNS wurde säulenchromatographisch mit poly (U)-Sepharose 4 B bzw. oligo d (T)-Zellulose als Träger aufgetrennt. Dabei wurden 45 % bis 47 % der Gesamt-RNS gebunden. Die Frage, ob die nicht gebundene RNS eine mRNS darstellt, deren poly(A)-Ketten sich in verschiedenen Stadien des Auf- und Abbaues befinden, ist nicht beantwortet worden. Moyer et al. (1975) (29) haben dargelegt, daß die mit Hilfe der Formamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennten mRNS des VSV unabhängig von ihrer Bindung an oligo-d(T)-Zellulose identische RNS sind, die sich in verschiedenen Stadien der Polyadenylierung befinden.

Schließlich sedimentierte eine RNS der infizierten Zellen im 4 s Bereich. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Gemisch von virusspezifischer RNS und zellulärer RNS, da aus den nicht infizierten Zellen nach Einwirkung von Actinomycin D das gleiche Material isoliert wurde.

Die bis hierher durchgeführten Untersuchungen dienten einerseits dazu, Charakteristika des Masernvirus mit denen der Paramyxoviren zu vergleichen, zum anderen als Grundlage für die Untersuchung der Einwirkung von Cordycepin und Cycloheximid auf diese Synthesemechanismen des Masernvirus.

Cycloheximid wurde infizierten Verozellen zugesetzt und bewirkte eine Steigerung des Einbaues von ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenosin in die 12 s bis 36 s mRNS um das dreifache. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von Godchaux et al.

(1967) (13) an Retikulozyten und Robinson (1971) (35) am Sendaivirus, die eine Anhäufung der Polyribosomen in den infizierten Zellen nachwiesen. Hierbei verlangsamte das Cycloheximid die Einlagerung der Radionukleotide in die 50 s RNS und die Nukleokapside. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Replikation, nicht aber die Transskription des Masernvirusgenom von einer funktionsfähigen Proteinsynthese abhängt. Analoge Untersuchungen wurden über das NDV (7,19,41), das Sendaivirus (33,35,43), das Mumpsvirus (12) und das Rhabdovirus, VSV (30) veröffentlicht. Allerdings widersprechen die Ergebnisse über das Masernvirus denen von Kiley & Payne (1974) (20). Die zuletzt genannten wiesen eine ähnliche Wirkung des Cycloheximid auf die mRNS-Synthese nach. Jedoch fanden sie keine Veränderung der ^{3}H-Uridineinlagerung in die 50 s RNS und die Nukleokapside. Eine Erklärung für diesen Widerspruch konnte nicht gefunden werden, zumal von beiden Untersuchern die gleichen Zellen und der gleiche Virusstamm verwendet wurden.

Cordycepin unterbindet die Vermehrung des NDV und des Sendaivirus, aber nicht die des Influenzavirus (26). Bei diesen Untersuchungen wurde die virusspezifische mRNS nicht fraktioniert und deren poly (A)-Kettengehalt nicht quantitativ bestimmt. Trotzdem konnte die Unterbindung der Virusvermehrung festgestellt werden, indem Cordycepin die Synthese der jeweiligen poly (A)-Ketten störte. Bei genaueren Untersuchungen der Cordycepinwirkung auf die Synthese NDV spezifischer RNS wiesen Weiss und Bratt (1975) (41) nach, daß der poly (A)-Kettengehalt der viralen RNS durch Cordycepin nicht beeinflußt wurde. Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, daß Cordycepin die virale Proteinsynthese hemmt und diese Hemmung den Rückgang der Virusvermehrung verursacht hat. Eine ähnliche Störung der viralen Proteinsynthese wurde beim Mengovirus nachgewiesen (8). In der vorgelegten Arbeit wurde nachge-

wiesen, daß Cordycepin die Proteinsynthese in infizierten Zellen unterbindet und den Einbau von Radionukleotiden in die 12 s bis 36 s RNS und die 50 s RNS-Genome verhindert. Die geringe Einlagerung von ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenosin in die mRNS kann auf zwei Wegen erklärt werden. Die einfachste Erklärung wäre in der hohen Konzentration des Cordycepin (100 µg/ml) zu finden. Unter dieser Bedingung konkurriert das Cordycepin bei der RNS-Synthese mit dem markierten und dem nicht markierten Adenosin, wodurch die Synthese vollständiger transskriptiver Strukturen unterbunden wird. Zum zweiten gelang der Nachweis, daß Cordycepin mit Uridin beim Transport durch die eukaryontische Zellmembran konkurriert (31). Wahrscheinlich bewirkte in der vorliegenden Untersuchung Cordycepin eine ähnliche kompetitive Hemmung und behinderte somit den Transport des ^{3}H-Uridin in die infizierten Zellen. Eine ähnliche Erklärung dürfte für die Reduzierung der 50 s RNS und Nukleokapsidsynthese zutreffen. Wie vorher gezeigt, hängt die Replikation der Genome von der aktiven Proteinsynthese ab. Demnach muß die Unterbindung der Proteinsynthese durch Cordycepin zur Blockade der Genomsynthese führen.

Der verminderte poly (A)-Kettengehalt der 12 s bis 36 s mRNS bei der Einwirkung von Cycloheximid oder von Cordycepin war nicht verwunderlich. Sheiness und Darnell (1973) (37) wiesen nach, daß die poly (A)-Ketten der mRNS in eukaryontischen Zellen einer kontinuierlichen Aufspaltung unterworfen sind. Da jegliche mRNS, die unter Einwirkung dieser Substanzen in den Zellen synthetisiert wurde, wohl nicht von der Translation abhängig ist, wäre zu erwarten, daß diese RNS in einem verstärkten Maße dieser Aufspaltung unterliegt. Somit bleibt nur noch die Möglichkeit, daß Cordycepin mit seinem klassischen Mechanismus einwirkt, indem es die Synthese der poly (A)-Ketten blockiert (1,9). Jedoch müßte in diesem Fall eine vollständige Hemmung vorliegen und es dürften keine weiteren poly (A)-Ketten

synthetisiert werden.

Die niedergelegten Ergebnisse entsprechen weitgehend denen von Weiss und Bratt (1975) (41) über das NDV. Der einzige Unterschied besteht darin, daß in den NDV infizierten Zellen eine Verminderung des poly (A)-Kettengehaltes der mRNS nicht nachgewiesen werden konnte. Heute kann hierfür noch keine Begründung abgegeben werden. Bei den hier durchgeführten Versuchen war die Cordycepinkonzentration doppelt so hoch wie bei den Untersuchungen über das NDV. Dies könnte eine wirksamere kompetitive Hemmung bei der Ausnutzung des zellulären Adenosinpools bewirkt haben.

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse geben vermehrt Anlaß, das Masernvirus unter die Paramyxoviren zu klassifizieren.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die kinetischen Untersuchungen der Einlagerung von ^{3}H-Uridin in die Verozellen nach der Infektion mit Masernvirus zeigten, daß eine maximale Synthese virusspezifischer RNS zwischen 16 und 20 Stunden post infectionem auftrat. Die Sedimentationsanalyse mit Hilfe des Saccharosegradienten ermöglichte die Auftrennung von vier verschiedenen RNS-Anteilen in folgenden Sedimentationsbereichen: 4 s, 12 s bis 26 s, 28 s bis 36 s und 50 s. Die Behandlung mit Pankreas- und T_1-Ribonuklease lieferte den Nachweis, daß poly (A)-Ketten an die RNA der folgenden Sedimentationsbereiche angelagert sind: 12 s bis 26 s, 28 s bis 36 s und 50 s. Da die 50 s RNS, die aus Nukleokapsiden isoliert wurde, keine poly (A)-Ketten enthielt, dürfte sich das Resistenzverhalten der letzteren gegen Ribonukleasen durch das Auftreten doppelsträngiger Zwischenstufen der RNS-Synthese im 50 s Bereich erklären. Die Größe der poly (A)-Ketten der 12 s bis 36 s RNS belief sich zwischen 70 und 140 Nukleotiden. Durch die Behandlung der 12 s bis 36 s RNS und deren poly (A)-Ketten mit Polynukleotidphosphorylase wurde gezeigt, daß die poly (A)-Ketten an das 3'-Ende der RNS gebunden waren. Allerdings waren die RNA-Moleküle auf Grund der experimentellen Bedingungen an dieser Stelle durch ihre Sekundärstruktur geschützt.

Cycloheximid bewirkte in Verozellen nach der Infektion mit Masernvirus eine ca. dreifache Steigerung der ^{3}H-Uridineinlagerung in die 12 s bis 36 s mRNS. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte festgestellt werden, daß sich in den infizierten Zellen die Polyribosomen anreicherten, ohne daß Nukleokapside nachgewiesen werden konnten. Aus diesen Gründen erscheint es als wahrscheinlich, daß die

Masernvirus-RNS-Replikation im Gegensatz zur Transskription von einer aktiven Proteinbiosynthese abhängig ist.

Cordycepin (3'-Deoxyadenosin) unterbindet in infizierten Zellen die Synthese der mRNS und der RNS-Genome. Die Hemmung der mRNS-Synthese ist augenscheinlich nicht von der Unterbindung der poly (A)-Kettensynthese abhängig, da einige poly (A)-Ketten synthetisiert wurden und ihr Nachweis an der mRNS erfolgte. Es konnte gezeigt werden, daß Cordycepin die Proteinbiosynthese unterbindet, indem es die Aufnahme der Aminosäuren durch die Zelle behindert. Aus gleichem Grunde dürfte die Synthese der RNS-Genome unterbunden werden.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse geben vermehrt Anlaß,das Masernvirus unter die Paramyxoviren zu klassifizieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. V. ter Meulen für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit im Institut für Virologie, Würzburg, sowie für seine vielen wertvollen Ratschläge.

Herrn Dr. W.W. Hall danke ich besonders für die Überlassung des Virus und seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Fräulein Ingeborg Euler und Dorothea Müntjes möchte ich für ihre hervorragende Hilfestellung bei der Arbeit im Labor danken.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Schwerpunkt "Multiple Sklerose und verwandte Erkrankungen" (Az. Me 27/14) unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADSENIK, M., SALDITT, M., THOMAS, W., DARNELL, J.E. — Evidence that all messenger RNA molekules (exept histone messenger RNA) contain poly (A) sequences and that the poly (A) has a nuclear function. J. Mol. Biol. 71, 21-30 (1972).

2. BANERJEE, A.K., MOYER, S.A., RHODES, D.P. — Studies on the in vitro adenylation of RNA by vesicular stomatitis virus. Virology 61, 547-558 (1974).

3. BRATT, M.A., COLLINS, B.S., HIGHTOWER, L.L., KAPLAN, J., TSIPIS, J.E., WEISS, S.R. — Transcription and translation of Newcastle Disease Virus RNA. In Negative Strand Viruses, p. 387. Edited by B.W.J. Mahy and R.D. Barry. New York and London: Academic Press (1975).

4. BRATT, M.A., ROBINSON, W.S. — Ribonucleic acid synthesis in cells infected with Newcastle Disease Virus. J. Mol. Biol. 23, 1-21 (1967).

5. BRATT, M.A., ROBINSON, W.S. — Evidence for an RNA replicative intermediate in cells infected with Newcastle Disease Virus. J. Gen. Virol. 10, 139-145 (1971).

6. CARTER, C., SCHLUEDERBERG, A., BLACK, F.L. — Viral RNA synthesis in measles-infected cells. Virology 53, 379-383 (1973).

7. CAVELL, L. A., BRATT, M.A. — Relationship between ribonucleic acid-synthesizing capacity of ultraviolet-irradiated Newcastle Disease Virus and its ability to induce interferon. J. Virol. 8, 500-508 (1971).

8. COLBY, D.S., FINNERTY, V., LUCAS-LENARD, J. — Fate of mRNA in L cells infected with mengovirus. J. Virol. 13, 858-869 (1974).

9. DARNELL, J., PHILLIPSON, L., WALL, R., ADSENIK, M. — Polyadenylic acid sequences: role in conversation of nuclear RNA into messenger RNA. Science 174, 507-510 (1971).

10. DULBECCO, R., VOGT, J. — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. Exptl. Med. 99, 167 (1954).

11. EAGLE, H. — Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 432 (1959).

12. EAST, L.L. KINGSBURY, D.W. — Mumps virus replication in chick embryo lung cells: properties of ribonucleic acids in virions and infected cells. J. Virol. 8, 161-173 (1971).

13. GODCHAUX, W. III., ADAMSON, S.D., HERBERT, E. — Effects of cycloheximide on polyribosome function in reticulocytes. J. Mol. Biol. 27, 57-72 (1967).

14. GORSKI, J., MORRISON, M.R., Merkel, C.G., LINGEREL, J.B. Size heterogeneity of polyadenylate sequences in mouse globin messenger RNA. J. Mol. Biol. 86, 363-371 (1967).

15. HALL, W.W., MARTIN, S.J. Purification and characterization of measles virus. J. Gen. Virol. 19, 175-188 (1973).

16. HALL, W.W., MARTIN, S.J. The biochemical characteristics of the surface components of measles virus. J. Gen. Virol. 22, 363-374 (1974).

17. HALL, W.W., MARTIN, S.J., GOULD, E.A. Defective interfering particles produced during the replication of measles virus. Immunology 160, 155-164 (1974).

18. HALL, W.W., ter MEULEN, V. Polyadenylic acid (poly (A)) sequences associated with measles virus intracellular ribonucleic acid (RNA) species. J. Gen. Virol. 35, 497-510 (1977).

19. KAVERIN, N.V., VARICH, N.L. Virus-specific RNA formed in Newcastle Disease Virus infected cells after suppression of protein synthesis by cycloheximide. Archiv für die gesammte Virusforschung. 35, 378-384 (1971).

20. KILEY, M.P., PAYNE, F.E. Replication of measles virus: continued synthesis of nucleaocapsid RNA and increased synthesis of mRNA in the presence of cycloheximide. J. Virol. 14, 758-764 (1974).

21. KINGSBURY, D.W. Paramyxovirus replication. Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 59, 1-33 (1972).

22. KINGSBURY, D.W. Cell-free translation of paramyxovirus messenger RNA. J. Virol. 12, 1020-1027 (1973).

23. KINGSBURY, D.W. The molecular biology of the paramyxoviruses. Med. Microbiol. Immunol. 160, 73-83 (1974).

24. LEE, S.Y., MENDECKI, J., BRAWERMANN, G. A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly labelled polyribosomal RNA component of mouse sarcoma 180 ascites cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 68, 1331-1335 (1971).

25. LINDBERG, U., PERSSON, T. Isolation of RNA from KB cells by affinity chromatography of polyuridylic acid covalently linked to Sepharose. European Journal of Biochemistry. 31, 246-254 (1972).

26. MAHY, B.W.J., COX, N.J., ARMSTRONG, S.J., BARRY, R.D. Multiplication of influenza virus in the presence of cordycepin, an inhibitor of cellular RNA synthesis. Nature New Biology 243, 172-174 (1973).

27. MARSHALL, S., GILLESPIE, D. Poly U tracts absent from viral RNA. Nature New Biology 240, 43-45 (1972).

28. MARX, P.A., PRIDGEN, C., KINGSBURY, D.W. Location and abundance of poly (A) sequences in Sendai virus RNA molecules. J. Gen. Virol. 247-250 (1975).

29. MOYER, S.A., GRUBMAN, M.J., EHRENFELD, E., BANERJEE, A.K. Studies on the in vivo and in vitro messenger RNA species of vesicular stomatitis virus. Virology 67, 463-473 (1975)

30. PERLMAN, S.M., HUANG, A.S. RNA synthesis of vesicular stomatitis virus. V. Interactions between transcription and replication. J. Virol. 12, 1395-1400 (1973)

31. PLAGEMAN, P.G.W., ROTH, M.F. Permeation as a rate-limiting step in the phosphorylation of uridine and choline and their incorporation into macromolecules by Novikoff Hepatoma cells.Competitive inhibition by phenylethyl alcohol, persantin and adenosine. Biochemistry 8, 4782-4788 (1969)

32. PORTNER, A., BUSSEL, R.H. Measles virus ribonucleic and protein synthesis: Effects of 6-azauridine and cycloheximide on viral replication. J. Virol. 11, 46-53 (1973)

33. PORTNER, A., KINGSBURY, D.W. Identification of transcriptive and replicative intermediates in Sendai virus-infected cells. Virology 47, 711-725 (1972)

34. PRIDGEN, C., KINGSBURY, D.W. Adenylate-rich sequences in Sendai virus transcripts from infected cells. J. Virol. 10, 314-317 (1972)

35. ROBINSON, W.S. Sendai virus RNA synthesis and nucleocapsid formation in the presence of cycloheximide. Virology 44, 494-502 (1971)

36. SCHLEUDERBERG, A. Measles virus RNA. Biochemical and Biophysical Research. Communications 42, 1012-1015 (1971)

37. SHEINESS, P., DARNELL, J.E. Polyadenylic acid segment in mRNA becomes shorter with age. Nature New Biology 241, 265-268 (1973)

38. SHELDON, R., KATES, J., KELLEY, D.E., PERRY, R.P. Polyadenylic acid sequences on the 3' termini of vaccinia messenger ribonucleic acid. Biochemistry 11, 3829-3834 (1972)

39. WARNER, J.R., KNOPF, P., RICH, A. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Science 49, 122 (1963)

40. WEISS, S.R., BRATT, M.A. Polyadenylate sequences on Newcastle Disease Virus mRNA synthesized in vivo and in vitro . J. Virol. 13, 1220-1230 (1974)

41. WEISS, S.R., BRATT, M.A. Effect of cordycepin (3'-Deoxy-adenosine) on virus-specific RNA species synthesized in Newcastle Disease Virus-infected cells. J. Virol. 16, 1575-1583 (1975)

42. WINSTON, S.H., RUSTIGAN, R., BRATT, M.A. Persistent infection of cells in culture by measles virus. III. Comparison of virus-specific RNA synthesized in primary and persistent infection in HeLa cells. J. Virol. 11, 926-932 (1973)

43. ZAIDES, V.M., NIKOLAYEVA, O.G., SELIKOVA, L.M., BUKRINSKAYA, G. Effect of protein synthesis inhibitors on the replication of virusinduced RNA in Sendai virus-infected cells. Acta Virologica 17, 355-358 (1973)

L E B E N S L A U F

Am 24. September 1947 wurde ich als Sohn des Apothekers Albert Genius und seiner Ehefrau Else, geb. Schnütgen in Bardenberg/Aachen geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Eschweiler/Aachen, wo ich die evgl. Volksschule und bis Dez. 1963 das Städt. Naturwissenschaftliche Gymnasium besuchte. Von dort wechselte ich auf die Jugenddorf Christophorusschule Altensteig/Kreis Calw, wo ich am 23. Juni 1967 das Abitur bestand.

Anschließend absolvierte ich das Pharmaziepraktikum, zunächst in der großväterlichen Rosenapotheke in Eschweiler/Aachen und dann in der Apotheke des Städt. Krankenhauses Düren/Rhld. In Aachen bestand ich am 25.9.1969 das Pharmazeutische Vorexamen und studierte ab WS 69/70 in Passau und ab WS 70/71 in Würzburg Pharmazie, wo ich am 23. Juli 1973 das Pharmazeutische Staatsexamen ablegte.

Zum SS 1973 immatrikulierte ich in Würzburg für das Medizinstudium und legte dort am 8. Okt. 1973 das Vorphysikum am 11. März 1975 das Physikum, am 31. Aug. 1976 das 1. med. Staatsexamen, am 5. April 1978 das 2. med. Staatsexamen ab, und schloß am 22. Mai 1979 mit dem 3. Staatsexamen mein Medizinstudium in Würzburg ab.

Meinen beruflichen Werdegang habe ich als Assistenzarzt in der Chir. Abteilung des Städt. Krankenhauses Rothenburg o.d.T. fortgesetzt.

Dieter Genius

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80